

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-14697

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)1月21日

C 12 P 7/64  
/(C 12 P 7/64  
C 12 R 1:645)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑭ 発明の名称 エイコサペンタエン酸の製造方法

⑮ 特 願 昭61-158651

⑯ 出 願 昭61(1986)7月8日

⑰ 発 明 者 新 免 芳 史 京都府乙訓郡大山崎町円明寺鳥居前8の1  
⑰ 発 明 者 清 水 昌 京都府京都市中京区西の京伯楽町14  
⑰ 発 明 者 山 田 秀 明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1  
⑱ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
⑲ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

エイコサペンタエン酸の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

1. モルティエラ(Mortierella)属に属し、エイコサペンタエン酸生産能を有する微生物を培養してエイコサペンタエン酸、又はエイコサペンタエン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてエイコサペンタエン酸を採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸の製造方法。

2. 培養開始時より、または最適生育温度で培養した後に最適生育温度以下の温度で培養することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 培地へ炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は醗酵法によるエイコサペンタエン酸の製造方法に関する。

## (従来技術)

従来からエイコサペンタエン酸(以下EPAという)の生産方法としては、魚油またはある種の藻類より抽出、精製する方法がとられている。しかしながら、いずれの方法においても、魚油中のEPA含量は低く、さらには不完全な精製、濃縮では魚臭が残る等、また藻類の培養には、ある一定以上の光照射が必要条件である等、残されている問題は多い。

また、モルティエラ(Mortierella)属の微生物を用いるEPAの製造方法は知られていない。

## (発明が解決しようとする問題点)

本発明は、従来EPAを生産する能力を有することが知られていなかったモルティエラ属微生物を使用して、安価な常用の培地を用いて、高収率で、しかも単純な工程でEPAを製造することができる方法を提供しようとするものである。

## (問題点を解決するための手段)

上記の目的はモルティエラ属に属しEPA生産能を有する微生物を培養してEPA又はEPAを含有する脂質を生成せしめ、そしてEPAを採取することを特徴とするEPAの製造方法により達成される。

## (具体的な説明)

本発明においては、モルティエラ属に属し、EPA生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物として、例えばモルティエラ・エロンガタ(*Mortierella elongata*)IFO 8570、モルティエラ・エキシグア(*Mortierella exigua*)IFO 8571、モルティエラ・ヒグロフィラ(*Mortierella hygrophila*)IFO 5941等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、財団法人醗酵研究所からなんら制限なく入手することができる。

また、本発明者がら土壤から分離した菌株モルティエラ・エロンガタSAM 0219(微工研菌寄第

8703号)を使用することもできる。

次に、上記の菌株SAM 0219(微工研菌寄第8703号)の菌学的性質を記載する。

各培地における生育状態

培養条件: 25℃、暗黒下

## 1. 麦芽エキス寒天培地

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーは直径28-31mm、培養5日目のコロニーは直径65-72mm、コロニーは浅裂状を呈する、気菌糸の発達は乏しい、胞子のう胞子の形成は良好、胞子のう柄は気菌糸より生じる、ニンニクに類似した臭いあり。

## 2. バレイショ・ブドウ糖寒天培地

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーは直径27-31mm、培養5日目のコロニーは直径75-80mm、コロニーはバラの花状を呈する、コロニー中心部で気菌糸が著しく発達する、コロニーの裏側は黄白色あるいは黄色、胞子のう胞子の形成は不良、ニンニクに類似した臭いあり、臭いはやや強い。

(3)

## 3. ツァベック寒天培地

コロニーの生育は比較的良好、培養2日目のコロニーの直径は22-24mm、培養5日目のコロニーの直径は50-53mm、気菌糸の発達は乏しい、気菌糸が密にからまりあうことがある。胞子のう胞子の形成は非常に良好、胞子のう柄は気菌糸より生じるニンニクに類似した臭いあり。

## 4. LCA寒天培地(培地の調製方法は、三浦宏一郎、工藤光代著“水生不完全菌のための一寒天培地”日本菌学会会報11巻、116-118頁、1970年に従った)

コロニーの生育は良好、培養2日目のコロニーの直径は27-29mm、培養5日目のコロニーは直径64-66mm、コロニーは浅裂状を呈する、気菌糸の発達はコロニーの中心部を除いて乏しい、胞子のう胞子の形成は良好。胞子のう柄は気菌糸より生じる。ニンニクに類似した臭いあり。

(5)

(4)

## 検鏡観察

各培地の検鏡標本およびコロニーの直接検鏡で、胞子のう柄、胞子のう柄の分岐の仕方、胞子のう、胞子のう胞子などを観察した。

胞子のう柄は長さ87.5-320 $\mu$ m、幅は基部で3-7.5 $\mu$ m、先端に向けて先細り、1.0-2.5 $\mu$ mとなる。胞子のう柄はしばしば基部で分岐する。胞子のうは球形、直径15-30 $\mu$ m、内部に多数の胞子のう胞子を含む、離脱後やや不明瞭なカラーを残す。胞子のう胞子は楕円形、希に腎臓形、表面は平滑、7.5-12.5 $\times$ 5-7.5 $\mu$ m、厚膜胞子は比較的多数形成される。単独、希に連鎖することがある。時に数本の菌糸を周囲に出ることがある。楕円形また垂球形、12.5-30 $\times$ 7.5-15 $\mu$ m。または直径12.5-15 $\mu$ m。接合胞子は観察されない。

## 3. 生理的性質

最適生育条件

pH: 6-9

温度: 20-30℃

(6)

## 生育の範囲

pH: 4 - 10

温度: 5 - 40℃

以上の菌学的諸性質に従い本発明の菌株 (SAM-0219) の分類学的位置の検索を、J.A.von Arx, "The Genera of Fungi sporulating in Pure Culture," 3rd ed., J.Cramer, 1981、および K.H.Domsch, W.Gams, & T.H.Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980 に準拠して求めると、胞子のう柄の先端に球状の胞子のうを形成する、柱軸を持たない、胞子のう胞子に付属糸がない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、ということから本菌株は Mortierella 属に属する真菌であると考えられる。

そこで、W.Gams, "A Key to the species of Mortierella," Persoonia 9, 381-391, 1977 に準拠して既知の Mortierella 属の種類と菌学的諸性質を比較すると、本菌株はコロニーがピロード状でない、培養菌糸がニンニクに類似した臭いを発する、胞子のう柄が長さ 87.5 - 320 μm で分

岐は下部でのみ生じ、葡萄の房状に分岐しない、胞子のうは内部に多数の胞子のう胞子を含む、ということから Mortierella 属 Mortierella 亜属 (Sugen. Mortierella) Hygrophila 節 (Sect. Hygrophila) に含まれると考えられる。Hygrophila 節には 22 種が含まれている。本菌株とこれら 22 種と菌学的諸性質を比較すると、本菌株は Mortierella zychae, M.elongatula, および M.elongata の 3 種に類似すると考えられる。そこで、K.H.Domsch, W.Gams, & T.-H.Anderson, "Compendium of Soil Fungi," Academic Press, 1980, W.Gams, "Some new or noteworthy species of Mortierella," Persoonia 9, 111-140, 1977)、および G.Linnemann, "Mortierella Coemans 1863," H. Zycha & R.Siepmann, "Mucorales Eine Beschreibung Aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe," pp.155-140, J.Cramer, 1969 を参考にし、本菌株とこれら 3 種と菌学的諸性質を比較した。本菌株は、M.zychae とは胞子のう柄の長さで、基部の幅、胞子のうの大きさで、明瞭に異なる。

(7)

(8)

M.elongata とは胞子のう胞子の形態と大きさで、明瞭に異なる。M.elongatula とは胞子のう柄がやや短い、厚膜胞子の形態が楕円形または垂珠形でときに連鎖することがあり、さらに厚膜胞子がときに数本の菌糸を周囲に出す、という点で異なるが、本発明者らはこのような差異は本菌株を Mortierella elongata と別種であるとするには十分でないと判断した。そこで、本発明者らは本菌株を Mortierella elongata SAM 0219 と同定した。SAM 0219 株は昭和 61 年 3 月 19 日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 (FRI) に受託番号 FERM P-8703 として寄託されている。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものがいずれも使用できるが、これらに限られるも

(9)

のではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステイプリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は 0.1 - 30 重量%、好ましくは 1 - 10 重量%、窒素源は 0.01 - 5 重量%、好ましくは 0.1 - 2 重量%の濃度とし、さらに炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩または油脂を添加しても良い。又、培養温度は 5 - 40℃、好ましくは培養開始から 10 - 20℃とするか、又は 20 - 30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後 10 - 20℃にて培養を続けて EPA を生産せしめる。このような温度管理により、生成脂肪酸中の EPA の比率を上昇せしめることができる。培地の pH は 4 - 10、好ましくは 6 - 9 とし

(10)

て、通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行なう。培養は通常2～10日間行う。

固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50～100重量%の水を加えだぶすま、もみから、米ぬか等を用い、5～40℃、好ましくは前記の温度において、3～14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源および、添加物として、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩、または油脂を加えることができる。

このように培養して、菌体内に、EPAを含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、次のようにしてEPAの採取を行なう。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、

ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出や、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のEPAを含有した脂質が得られる。

また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び/又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、EPAが脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを、直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えばエイコサペンタエン酸メチルとして分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、

(11)

培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸等（これらも、EPAのエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、EPAのメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸5%～10%、BF<sub>3</sub>-メタノール10%～50%等により、室温にて1～24時間処理するのが好ましい。

前記の処理液からエイコサペンタエン酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶剤で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水酢酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルから成る混合物が得られる。この混合物中には、目的とするエイコサペンタエン酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等が含まれている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物からエイコサペンタエン酸メチルエステルを単離する

(13)

(12)

には、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接体法等を、単独で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離されたエイコサペンタエン酸メチルからEPAを得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

また、EPAをそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2～3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

グルコース5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び麦芽エキス0.3%を含む培地（pH6.0）50mlを500ml容坂口フラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロン

(14)

ガタSAM 0219(FERM P-8703) 1白金耳を接種し、レシプロシェーカー(110rpm)により12℃で7日間振盪培養した。培養後、濾過にて菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥した。これにより、0.7gの乾燥菌体を得た。この菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いるBligh & Dyerの抽出法によって総脂質を抽出したところ、150mgの脂質が得られた。この脂質を無水メタノール-塩酸(95:5)を用いて、20℃にて3時間処理することによってメチルエステル化し、エーテルで抽出して9.5mgの脂肪酸メチルを得た。この脂肪酸メチルの組成はガスクロマトグラフィーによる分析で、パルミチン酸メチル12%、ステアリン酸メチル12%、オレイン酸メチル24%、リノール酸メチル5%、γ-リノレン酸メチル8%、ビスホモγ-リノレン酸メチル5%、アラキドン酸メチル10%、エイコサペンタエン酸メチル13%、その他11%であることが認められた。この混合物脂肪酸メチルをカラムクロマトグラフィーによって分離し、エイコサ

(15)

ルエステル化を行なったところ、総脂質13g、及び混合脂肪酸メチル8gを得た。このものの組成はパルミチン酸メチル13%、ステアリン酸メチル14%、オレイン酸メチル28%、リノール酸メチル8%、γ-リノレン酸メチル8%、ビスホモγ-リノレン酸メチル3%、アラキドン酸メチル13%、エイコサペンタエン酸メチル6%、その他7%であることが認められた。エイコサペンタエン酸メチルの生成量は培地当り、0.10g/ℓ、乾燥菌体当り9.6mg/gであった。

又、培養終了後、濾過によって得られた培養濾液4,270mlを乾燥後、実施例1と同様に抽出、加水分解、メチルエステル化を行なったところ、7%のエイコサペンタエン酸メチルを含む混合脂肪酸メチル8.2mgを得た。

#### 実施例3

モルティエセラ・エキシクア(*Mortierella exiqua*,IFO 8571)、及びモルティエセラ・ヒグロフィラ(*Mortierella hygrophila*,IFO 5941)について実施例1と同様な操作を行なったところ、そ

(17)

ペンタエン酸メチル画分を分取し、ロータリーエバポレーターによって溶媒を留去した結果、6.5mgの精製されたエイコサペンタエン酸メチルを得た。本標品と市販のエイコサペンタエン酸メチル標準サンプルについて、ガスクロマトグラフィー分析、高速液体クロマトグラフィー分析、質量分析、及びNMR分析によって比較を行なったところ、両者はいずれの分析においても一致した。精製前及び精製後のエイコサペンタエン酸メチル量は培地当り、それぞれ0.25mg/ml及び0.13mg/ml、乾燥菌体当りそれぞれ1.8mg/g及び9mg/gであった。

#### 実施例2

実施例1と同じ組成の培地5ℓを15ℓジャーファーメンターに仕込み、120℃で40分間殺菌後、モルティエセラ・エロンガタSAM 0219(FERM P-8703)の前培養液200mlを接種した。18℃、通気量0.5v.v.mで5日間通気攪拌培養を行ない、得られた湿菌体150g(乾燥重量50g)について、実施例1と同様に抽出、加水分解、及びメチ

(16)

ルそれぞれ4.7mg及び7.2mgの脂肪酸メチルが得られた。

これらの脂肪酸メチル中に含まれるエイコサペンタエン酸メチルを単離・精製したところ、それぞれ4.8mg、及び7.4mgが得られた。

#### 実施例4

グルコース2%、酵母エキス1%、Tween 20 0.2%及び、種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム又は油脂0.5%を含む培地(pH6.0)20mlを100ml容マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエセラ・エロンガタSAM 0219(FERM P-8703) 1白金耳を接種し、ロータリーシェーカー(200rpm)により28℃で5日間培養した。得られた菌体について実施例1と同様に抽出、加水分解、及びメチルエステル化を行なった。培地に添加した種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、及び油脂のそれぞれについて、得られた乾燥菌体重量、総脂質量、総脂肪酸メチル量、エイコサペンタエン酸メチル含量、及び培地当りのエイコサペンタエン酸メチル生成量は下表のようになった。

(18)

添加物	乾燥菌体 (mg)	総脂質 (mg)	総脂肪酸 メチル量 (mg)	エイコサペンタエン 酸メチル 量(%)	エイコサペンタエン 酸の増地 当り生成量 (mg/ml)
ヘキサ デカン	310	80	73	0.50	0.018
オクタ デカン	330	84	74	0.32	0.012
オレイン酸 ナトリウム	290	78	70	0.41	0.014
リノール酸 ナトリウム	300	81	69	9.2	0.32
オリ ブ油	380	92	79	0.63	0.024
ヤシ油	390	95	82	1.2	0.049
アマニ 油	370	90	80	11	0.44
無添加			(測定不能)		

標準培地にアマニ油又はリノール酸ナトリウムを添加した場合、エイコサペンタエン酸の生成量は増地 1 ml 当り、0.44 mg、10.32 mg ときわめて高い濃度となった。その他、炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩または油脂を添加した場合も著量のエイ

コサペンタエン酸を生成したが、無添加の場合はほとんど生成がみられなかった。

#### 実施例 5

実施例と同じ組成の増地 20 ml を 100 ml 容量マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (FERM P-8703) 1 白金耳を接種し、ロータリーシェーカー (200 rpm) により、28℃で5日間培養後、培養温度を12℃に変え、同様にして3日間培養した。得られた菌体について実施例1と同様に抽出、加水分解、メチルエステル化を行なったところ、エイコサペンタエン酸メチルを9%含む、混合脂肪酸メチル 7.5 mg を得た。

(19)

(20)

#### 受託番号変更届

昭和62年1月28日

特許庁長官 黒田明雄 殿

#### 1. 事件の表示

昭和61年特許願第158651号

#### 2. 発明の名称

エイコサペンタエン酸の製造方法

#### 3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

名称 (190) サントリー株式会社

#### 4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 (504) 0721

氏名 井埋士 (6579) 青木 朗 之青井  
(外4名) 印朗士

#### 5. 旧寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

#### 6. 旧受託番号

微工研菌寄第8703号

(FERM P-8703)

#### 7. 新寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

#### 8. 新受託番号

微工研条寄第1239号

(FERM BP-1239)

#### 9. 添付書類の目録

新寄託番号を証明する書面 1 通



## 手続補正 (自発)

昭和62年1月28日

特許庁長官 黒田 明 雄 殿

## 1. 事件の表示

昭和61年特許願第158651号

## 2. 発明の名称

エイコサペンタエン酸の製造方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190)サントリー株式会社

## 4. 代理人

住所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 (504) 0721

氏名 弁理士 (6579) 青 木 朗

(外4名)



加入する。

## 『実施例6』

グルコース2%、酵母エキス1%を含む培地 (pH 6.0) 20 ml を 100 ml 容マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (FERM P-8703) (FERM BP-1239) 1白金耳を接種し、ロータリーシェーカー (200 rpm) により28℃で4日間培養後、種々の脂肪酸ナトリウム又は油脂100 mg を120℃で15分間殺菌後、添加し、さらに同様に2日間培養した。得られた菌体について、実施例1と同様に抽出、加水分解、及びメチルエステル化を行った。培地に添加した種々の脂肪酸ナトリウム、及び油脂それぞれについて、得られた乾燥菌体当り、及び培地当りのエイコサペンタエン酸メチル生成量は下表のようになった。

## 5. 補正の対象

- (1) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
- (2) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄
- (3) 受託証の写し

## 6. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙の通りに補正する。
- (2) ① 明細書第4頁第1行目、及び第2行目から3行目の「8703号」の次に「(微工研条寄第1239号)」を加入する。  
② 同第9頁第12行目「寄託されている。」を「寄託され、微工研条寄第1239号 (FERM BP-1239) として国際寄託に移管された。」に補正する。  
③ 同第15頁第1行目、第16頁第16行目から第17行目、第18頁第12行目、及び第20頁第6行目「(FERM P-8703)」の次に「(FERM BP-1239)」を加入する。  
④ 同第19頁第18行目「10.32 mg」を「0.32 mg」に補正する。  
⑤ 同第20頁第13行目の後に次の記載を

(2)

添 加 物	エイコサペンタエン酸メチル	
	mg/g	mg/ml
ステアリン酸ナトリウム	0.4	0.006
オレイン酸ナトリウム	0.6	0.010
リノール酸ナトリウム	3	0.043
リノレン酸ナトリウム	3	0.047
オリーブ油	0.1	0.003
大豆油	12	0.25
アマニ油	10	0.19
無 添 加	(測定不能)	

上記のごとく、培養途中(培養4日後)に脂肪酸、油脂類などを添加することにより、対照無添加区で認められなかったエイコサペンタエン酸が、培地1 ml 当り0.006 mg ~ 0.25 g 生成した。」

- (3) 受託証の写しを追完する。

## 7. 添付書類の目録

- (1) 補正特許請求の範囲 1 通
- (2) 受託証の写し 1 通

## 2. 特許請求の範囲

手続補正 (自発)

昭和62年6月18日

特許庁長官 黒田 明雄 殿

1. モルティエレラ (Mortierella) 属に属し、エイコサペンタエン酸生産能を有する微生物を培養してエイコサペンタエン酸、又はエイコサペンタエン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてエイコサペンタエン酸を採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸の製造方法。

2. 培養開始時より、または最適生育温度で培養した後最適生育温度以下の温度で培養することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 培地へ炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 培養中の培養液へ、脂肪酸、脂肪酸塩または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

## 1. 事件の表示

昭和61年特許願第158651号

## 2. 発明の名称

エイコサペンタエン酸及びこれを含有する脂質の製造方法(新名称)

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190)サントリー株式会社

## 4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青木 朗

(外4名)

## 5. 補正により増加お発明の数 1



## 6. 補正の対象

- (1) 明細書の「発明の名称」の欄
- (2) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
- (3) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

## 7. 補正の内容

(1) 明細書の「発明の名称の欄」を『エイコサペンタエン酸<sup>エイコサ</sup>及びこれを含有する脂質<sup>ペンタエン酸</sup>の製造方法』に補正する。

(2) 特許請求の範囲を別紙の通りに補正する。

(3) ① 明細書第1頁第19行目「エイコサペンタエン酸」を『エイコサペンタエン酸及びこれを含有する脂質』に補正する。

② 同第2頁第17行目「EPA」を『EPA及びこれを含有する脂質』に補正する。

③ 同第3頁第5行目「製造方法」を『製造方法；及びモルティエレラ属に属しエイコサペンタエン酸生産能を有する微生物を培養してエイコサペンタエン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてこれを採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸を含有する脂質の製造方法』に補正する。

## 8. 添付書類の目録

特許請求の範囲

1通

(2)

(3)



## 2. 特許請求の範囲

1. モルティエレラ(Mortierella)属に属し、エイコサペンタエン酸生産能を有する微生物を培養してエイコサペンタエン酸、又はエイコサペンタエン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてエイコサペンタエン酸を採取することを特徴とするエイコサペンタエン酸の製造方法。

2. 培養開始時より、または最適生育温度で培養した後に最適生育温度以下の温度で培養することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 培地へ炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 培養中の培養液へ、脂肪酸、脂肪酸塩または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

5. モルティエレラ(Mortierella)属に属し、エイコサペンタエン酸生産能を有する微生物を培養してエイコサペンタエン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてこれを採取することを特徴とす

るエイコサペンタエン酸を含有する脂質の製造方法。

6. 培養開始時より、または最適生育温度で培養した後に最適生育温度以下の温度で培養することを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の方法。

7. 培地へ炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩、または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の方法。

8. 培養中の培養液へ、脂肪酸、脂肪酸塩または油脂を添加することを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の方法。

(1)

(2)

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第1部門第1区分  
【発行日】平成6年(1994)1月18日

【公開番号】特開昭63-14697  
【公開日】昭和63年(1988)1月21日  
【年通号数】公開特許公報63-147  
【出願番号】特願昭61-158651  
【国際特許分類第5版】

C12P 7/64 8114-4B  
//C12P 7/64  
C12R 1:645 )

#### 手続補正書

平成5年4月16日

特許庁長官 麻 生 波 殿

#### 1. 事件の表示

昭和61年特許願第158651号

#### 2. 発明の名称

エイコサペンタエン酸及びこれを含有する脂質  
の製造方法

#### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190)サントリー株式会社

#### 4. 代理人

住所 千105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号  
静光虎ノ門ビル 電話 03-3504-0721

氏名 弁理士(6579)青木 朗

(外4名)

#### 5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

#### 6. 補正の内容

(1) 明細書第3頁第15行目「(Mortierella  
hygrophila)」を「(Mortierella hygrophila)」に  
補正します。

(2) 同第7頁第13行目「Mortierella」を  
「Mortierella」に補正します。

(3) 同第7頁第20行目「発っする」を「発する」  
に補正します。

(4) 同第8頁第4行目「Mortierella)Hygrophila」  
を「Mortierella)Hygrophila」に補正します。

(5) 同第8頁第8行目「zychae, M.elongatula」  
を「zychae, M.elongatula」に補正します。

(6) 同第9頁第7行目「Mortierella elongata」  
を「Mortierella elongata」に補正します。

(7) 同第17頁第17行目「エキシクア」を「エキ  
シグア」に補正します。

(8) 同第17頁第18行目「exiqua」を「exigua」  
に補正します。

(9) 同第17頁第19行目「Mortierella  
hygrophila」を「Mortierella hygrophila」に  
補正します。

(10) 同第19頁下から第3行目「10.32」を「0.32」  
に補正します。

(11) 同第20頁第4行目「実施例」を「実施例1」  
に補正します。

- Byrne, G. and O. P. Ward, "Effect of Nutrition on Pellet Formation by *Rhizopus arrhizus*", *Biotechnol. Bioeng.* 33, 912-914 (1989b).
- Holub, B. J. and C. M. Skeaff, "Nutritional Regulation of Cellular Phosphatidylinositol", *Meth. Enzymol.* 141, 234-244 (1987).
- Kengo, A., S. Yoshifumi, Y. Hideaki and S. Sakayu, "Process for Production of Fatty Acids Having High Degree of Unsaturation", *Eur. Pat. Appl.* 89307062.3. (1989).
- Morrin, M. and O. P. Ward, "Biotransformation of Progesterone to 11- $\alpha$ -Hydroxyprogesterone by Different Forms of *Rhizopus arrhizus*", *Biotechnol. Lett.* 11, 319-324 (1989a).
- Morrin, M. and O. P. Ward, "Studies on Interaction of Carbopol-934 with Hyphae of *Rhizopus arrhizus*", *Mycol. Res.* 92(3), 265-272 (1989b).
- Pearlman, D., "Fermentation", in "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 9, M. Grayson, Ed., John Wiley & Sons, New York (1980), pp. 861-880.
- Reisman, H. B., "Economic Analysis of Fermentation Processes", CRC Press, Boca Raton (1988).
- Shimizu, S., Y. Shinmen, K. Akimoto, M. Sugano and H. Yamada, "Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Filamentous Fungi", *Vitamin* 66, 289-299 (1992).
- Shinmen, Y., S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawushima and H. Yamada, "Production of Arachidonic Acid by *Mortierella Fungi*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 11-16 (1989).
- Simopoulos, A. P., "Summary of the NATO Advanced Research Workshop on Dietary  $\omega$ -3 and 2-6 Fatty Acid: Biological Effects and Nutritional Essentiality", *J. Nutr.* 119, 521-528 (1989).
- Stadler, T., J. Mollion, M.-C. Verdu, Y. Karamanos, H. Morvan and D. Christiaen, "Algal Biotechnology", Elsevier, London (1988).
- Sujbidor, J., S. Dobronova and M. Certik, "Arachidonic Acid Production by *Mortierella* sp. S-17. Influence of C/N Ratio", *Biotechnol. Lett.* 12, 455-456 (1990).
- Totani, N., A. Watanabe and K. Oba, "An Improved Method of Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina*", *J. Japan. Oil Chem. Soc.* 36, 328-331 (1987).
- Totani, N. and K. Oba, "The Filamentous Fungus *Mortierella alpina*, High in Arachidonic Acid", *Lipids* 22, 1060-1062 (1987).
- Vonshak, A., "Porphyridium", in "Micro-algal Biotechnology", M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, Ed., Cambridge University Press, Cambridge (1988), pp. 122-134.
- Yamada, H., S. Shimizu, Y. Shinmen, H. Kawushima and K. Akimoto, "Biotechnological Processes for Production of Polyunsaturated Fatty Acid", *J. Dispersion Sci. Technol.* 10(445), 561-579 (1989).
- Yongmanitchai, W. and O. P. Ward, "Omega-3 Fatty Acids: Alternative Sources of Production", *Process Biochem.* 24, 117-125 (1989).

Manuscript received September 7, 1994; revised manuscript received November 9, 1994; accepted for publication November 16, 1994.